



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Sinergia bactericida del extracto etanólico de *Vitis vinífera* con oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTORA:

Villanueva Valdez, Jhenny Yovana (ORCID: 0000-0003-2512-2453)

ASESORES

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío Del Pilar (ORCID: 0000- 0002-6764-4068)

Dra. Otiniano Garcia, Nelida Milly Esther (ORCID: 0000-0001-9838-4847)

Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

TRUJILLO – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A DIOS

A Dios, por su amor y bondad a través de los largos años de mi vida al guiarme y bendecirme enormemente. Por forjar mi camino a lo largo de la carrera de Medicina en la Universidad César Vallejo, por el coraje que puso en mí para superar las adversidades. Por hacer que mejore como persona cada día a través de mis errores. Y por el regalo más valioso de mi vida, mi familia.

A MIS PADRES

Por ser mi ritmo sinusal, mi inspiración de superación, por el sacrificio enorme que realizan cada día para que no me falte algo. Gracias a su amor infinito he podido lograr lo que ahora soy. Agradecida por la confianza que me dieron desde siempre. Y aquí estoy sin querer defraudarlos nunca.

A MIS ABUELOS Y HERMANOS

A mis abuelos por ser la razón de mi vida, ellos fueron el motivo porque decidí estudiar una carrera de ciencias de la salud. Gracias por sus atenciones desde que nací.

A mis hermanos por ser mi ejemplo de lucha constante para prosperar, por su apoyo incondicional en cada faceta de mi vida

AGRADECIMIENTO

A la universidad César Vallejo, por haberme albergado en su casa de estudios en este largo trayecto de pregrado para forjar mi camino profesional y humano.

A mis asesores, Dra. Llaque Sánchez, María Rocío Del Pilar, Dra. Otiniano Garcia, Nelida Milly y Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo; quienes con la paciencia necesaria y con sus enseñanzas han logrado el desarrollo de este trabajo de forma satisfactoria.

Índice de contenidos

CARÁTULA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
III. METODOLOGÍA	12
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	12
3.2. Variables y operacionalización.....	12
3.3. Población, muestra y muestreo.....	12
3.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos.....	13
3.5. Procedimiento.....	13
3.6. Método de análisis de datos.....	14
3.7. Aspectos éticos.....	14
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIÓN	19
VI. CONCLUSIONES	23
VII. RECOMENDACIONES	24
REFERENCIAS	25
ANEXOS	33

Índice de tablas

Tabla 1. Datos descriptivos del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de <i>Vitis vinífera</i> y oxacilina a 1 µg. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	15
Tabla 2. Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de <i>Vitis vinífera</i> y oxacilina a 1 µg. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	16
Tabla 3. Análisis post ANOVA de Tukey, del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de <i>Vitis vinífera</i> y oxacilina a 1 µg. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	17

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de Cajas y bigotes, del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de <i>Vitis vinífera</i> y oxacilina a 1 µg. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	18
--	----

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó la sinergia bactericida del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* (EEVV) con oxacilina (OXA) a 1 µg sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; considerándose 4 grupos: G1: extracto etanólico, G2: oxacilina, G3: combinación del extracto etanólico y OXA G4: grupo de control, con 10 repeticiones de cada grupo; obteniéndose los siguientes resultados: Los halos de inhibición del EEVV, mostraron una media de inhibición de 34,60 mm (DS: $1,57762 \pm 0,49889$, IC 95% 33,4714 - 35,7286), siendo mayor que lo considerado por el CLSI (>13 mm), pero no supera a la OXA (43,60 mm, DS: $1,57762 \pm 0,49889$, IC 95% 42,4714 - 44,7286). La combinación de EEVV más OXA no evidenció tener efecto sinérgico (43,10 mm, DS: $1,19722 \pm 0,37859$, IC 95% 42,2436 - 43,9564). El análisis de varianza ANOVA reportó una diferencia significativa entre los promedios de los halos de inhibición ($p:0.000$). La prueba post ANOVA de Tukey, determinó que no existe diferencia entre OXA sola y la combinación con EEVV. Conclusión: el extracto etanólico de *Vitis vinífera* al 100% combinado con oxacilina, no evidencia halos de inhibición mayores a los obtenidos con OXA, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, oxacilina, *Vitis vinífera*, extracto etanólico, bactericida.

ABSTRACT

The present study assessed the bactericidal synergy of concentrated ethanol extract of *Vitis vinifera* seed (EEVV) with oxacillin (OXA) at 1 µg on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; in which four groups were considered: G1: ethanol extract, G2: oxacillin, G3: combination of ethanol extract and OXA G4: control group, with 10 replicates from each group; obtaining the following results: EEVV inhibition zones, showed an average inhibition of 34.60 mm (SD: 1.57762 ± 0.49889, CI 95% 33.4714 - 35.7286), being higher than the one considered by the CLSI (>13 mm), but not higher than OXA (43.60 mm, SD: 1.57762 ± 0.49889, CI 95% 42.4714 - 44.7286). The combination of EEVV plus OXA was not shown to have a synergistic effect (43.10 mm, SD: 1.19722 ± 0.37859, CI 95% 42.2436 - 43.9564). The Analysis of variance ANOVA revealed a significant difference between the averages of the inhibition zones (p:0.000). Tukey post ANOVA test determined that there is no difference between OXA itself and the combination with EEVV. Conclusion: the ethanol extract of *Vitis vinifera* 100% combined with oxacillin, does not show inhibition zones higher than those obtained with OXA, on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, oxacillin, *Vitis vinifera*, ethanol extract, bactericidal.

I. INTRODUCCIÓN

Las patologías infecciosas de piel y tejido blando en la población pediátrica son muy prevalentes, de fácil diseminación en los niños.¹ Estas infecciones son uno de los motivos de mayor demanda en la consulta pediátrica en establecimientos de atención primaria y atención ambulatoria.²

La tasa de infección en niños es aproximadamente de 28.4 casos por cada 100.000 personas.³ Tales infecciones son causadas por aerobios Gram positivos, donde el agente patógeno más frecuente es el *Staphylococcus aureus* porque en cultivos de infecciones de piel resulta en un 72 % para este germen. Este patógeno tiene como reservorio principal el hombre, coloniza piel y/o mucosa nasofaríngea. Genera infecciones cuando son diseminadas de las fosas nasales como aerosoles y por contacto entre personas.⁴ Las Infecciones, en muchas ocasiones se deben a la falta de educación en el aseo personal y hacinamiento.

El *Staphylococcus aureus* elabora una serie de toxinas y enzimas que contribuyen a la colonización y patogenia de la enfermedad.⁵ Genera desde leves infecciones de piel y tejidos blandos tales como una forunculosis, foliculitis e impétigo, hasta graves infecciones como una osteomielitis, neumonía, endocarditis y bacteriemias poniendo en peligro la vida del paciente.⁶

En cuanto a su tratamiento, *S. aureus* es sensible a cefalosporinas, aminoglucósidos, aun así, hay cepas que son multirresistentes, por lo que se debe determinar la sensibilidad antimicrobiana.⁵ Dentro de las opciones terapéuticas orales están cefalexina, amoxicilina más ácido clavulánico; dentro de los intravenosos esta oxacilina, cefazolina.⁷ Oxacilina ejerce su acción en la pared bacteriana al inhibir la síntesis de peptidoglicano, depende de la unión a la proteína ligadora de penicilina (PBPs) localizada en la pared bacteriana, luego conduce al debilitamiento y lisis bacteriana.⁸

La *Vitis vinífera* es usada con fines medicinales en enfermedades con patrón inflamatorio, bacteriano. Actualmente es considerada un fruto con acción farmacológica, contiene flavonoides un compuesto con gran capacidad de influir

en los factores biológicos como el ADN, sobre radicales libres y enzimas biológicas, se ha demostrado que la semilla ejerce efecto antimicrobiano.⁹ Tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y captadoras de radicales libres; como protector de la piel y anexos, de las mucosas; para facilitar su paso a través de la capa córnea de la piel.¹⁰

Según Escolona et al ¹¹ La OMS informó que el 80 % de habitantes del mundo hacen uso de plantas como remedio principal. En el Perú difícilmente se ha logrado determinar la cantidad exacta de personas que hacen uso de la fitoterapia debido a la tasa elevada de migración entre departamentos.¹²

El problema de investigación formulado fue: ¿Tiene sinergia bactericida la combinación del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* con oxacilina a 1 µg sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en un estudio *in vitro*?

Una de las consultas más frecuentes en la población pediátrica son las infecciones de la piel causadas por *Staphylococcus aureus* en un 72%. Además, el agente tiene como reservorio principal al hombre. Por tal motivo en el primer nivel de atención es prioritario su manejo ya que la tasa de infección es elevada. Según la OMS el 80% de la población mundial hace uso de fitoterapia. En este caso, se puede usar el extracto de semilla de *Vitis vinífera* para combatir patologías que son causadas por *Staphylococcus aureus*. Algunos tratamientos farmacológicos necesitan ser co administrados a fin de generar un efecto sinérgico, de modo que la oxacilina puede combinarse con el extracto etanólico de semillas de *Vitis vinífera*, ya que contienen compuestos polifenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos entre otros, es importante mencionar que estos compuestos no han demostrado efectos colaterales en su uso.

Además, por la gran accesibilidad a estas semillas que se tiene en el departamento de La Libertad no generaría costos excesivos que limiten su uso a fin de llevar un tratamiento sinérgico bactericida con oxacilina frente a *Staphylococcus aureus*.

El objetivo general: Evaluar la sinergia bactericida del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* con oxacilina a 1 µg sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en un estudio in vitro.

Los objetivos específicos: Establecer la actividad bactericida del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera*. Comprobar el efecto bactericida de la oxacilina a 1 µg sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Determinar la actividad bactericida de la combinación del extracto etanólico con el antibiótico.

Las hipótesis: H_1 : El extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* combinada con oxacilina a 1 µg evidencia sinergia bactericida sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. y H_0 : El extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* combinada con oxacilina a 1 µg no evidencia sinergia bactericida sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II. MARCO TEÓRICO

Kulastic et al¹³ (India, 2020) evaluaron las propiedades antibacterianas de diferentes variedades de semillas de *Vitis vinífera* L. Obtuvieron el extracto con etanol en varias concentraciones (50%, 60%, 70%), mostrando una actividad antibacteriana con un halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* de 12 mm, 16mm, 25 mm respectivamente según concentración del extracto etanólico en la variedad shiraz, determinaron una actividad antibacteriana lo que podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos, ácido gálico y la presencia de tres grupos hidroxilo y el sustituyente del anillo de benceno son eficaces contra las bacterias.

Defaz¹⁴ (Ecuador, 2019), investigó el efecto antibacteriano del extracto de cáscara de uva en comparación con la clorhexidina al 12 % sobre *streptococcus mutans* en estudio comparativo in vitro, a concentración de 75 y 50 %. La siembra fue en cajas Petri de agar sangre, identificó zona de inhibición de 9 mm a concentración de 75 % y de 8 mm a concentración de 50% del extracto. Concluye en que el efecto se debe a que el fruto posee un alto número de componentes polifenólicos.

Pavic et al¹⁵ (Croacia, 2019), investigaron la eficacia antibacteriana del extracto de la piel de uva en sus variedades merlot y blaufrankisch, consideraron el impacto de la defoliación sobre la actividad antibacteriana, usando el medio Mueller Hinton. Observaron que la variedad Merlot con defoliación inmediatamente después de la floración, mostró una actividad antibacteriana frente a *S. aureus* estadísticamente significativa, con concentración mínima inhibitoria de 13.75 ± 1.26 , porque tras ese proceso aumentó la concentración fenólica total lo que logró la mayor concentración de antocianinas conllevando a mejor efecto antibacteriano.

Abouzeed et al¹⁶ (África, 2018) evaluaron los compuestos antibacterianos, antioxidantes y fenólicos de los extractos de pasas de *Vitis vinífera*. Usaron el método de difusión de disco, con cefotaxima sódica 10 µg como control positivo. Observaron que el extracto acetónico de pasas exhibió actividad contra *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 14 mm y la cefotaxima con 20 mm. Se debe a que las pasas contienen potentes compuestos polifenólicos,

catequina, rutina y quercetina; rutina es uno de los compuestos que contribuyen a las propiedades antibacterianas.

Divya¹⁷ (India, 2018) Determinó que la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc usando el extracto de la cáscara de *Vitis vinífera* demostró ser muy eficaz como antimicrobiano in vitro en método de difusión de disco. Mostrando una zona de inhibición de 3.1 mm a concentración de 170 ppm de AgNPs en cultivo de *Staphylococcus aureus*, debido a que las nanopartículas de óxido de zinc tienen la capacidad de anclarse a la pared bacteriana y penetrarla y provoca cambios estructurales en la membrana, forman radicales libres al estar en contacto con las bacterias, las cuales están compuestas principalmente por azufre y fósforo que lleva a las nanopartículas a provocar una reacción con capacidad de dañar la membrana celular y hacerla porosa conllevando a la muerte celular, además modulan la transducción de señales en bacterias.

Caicedo¹⁸ (Ecuador, 2017) identificó la eficacia antibacteriana del extracto acuoso de semilla de uva al 100% sobre *streptococcus mutans* ATCC 35668, comparando con clorhexidina (0.12%) y agua como sustancias de control; usó medio de agar sangre. El efecto fue evaluado en 48 y 24 horas; Como resultados, la concentración del 100% del extracto de la semilla de uva identificó una zona de inhibición de 11 mm, para clorhexidina al 0.12% 10 mm y para agua 5 mm. Concluye que a concentración del 100% a las 48 horas presenta mayor efecto inhibitorio, se debe a la capacidad antioxidante dependiente del contenido de polifenoles totales, incluyendo ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, presentes en la fruta, además la actividad antibacteriana es menor cuando los extractos se obtienen a partir de las semillas después de la fabricación del vino.

Alkhulaifi et al¹⁹ (Arabia Saudita, 2017) investigaron el potencial antibacteriano de los extractos de semilla de uva, compararon sus propiedades con antibiótico estándar en placas con Agar Mueller Hinton, observaron zonas de inhibición de 20 mm ante *Staphylococcus aureus* utilizando el extracto de metanol; el fármaco estándar usado fue ampicilina (29 mm). Este efecto se debe a los compuestos flavonoides fenólicos biológicamente activos que actúan inhibiendo los factores de virulencia bacteriana, la formación de biopelículas, la reducción de la adhesión de los ligandos del hospedador y la neutralización de las toxinas

bacterianas; el ácido gálico modifica las membranas de las bacterias de manera irreversible generando efecto antibacteriano. Sugieren que el alcohol es el mejor disolvente para la extracción de compuestos activos (polifenoles) en comparación con el agua destilada. La actividad antibacteriana se debe principalmente a la interacción sinérgica entre los metabolitos secundarios de compuestos fenólicos.

Abdul et al²⁰ (Irak, 2016) realizaron un análisis químico y actividad antibacteriana de extractos de semilla de la uva (*Vitis vinífera*), usaron el método de difusión de disco, se realizó diluciones del extracto (1, 1/2 1/3, 1/4), los resultados fueron zonas de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 17 mm en concentración de 1 y 12 mm para concentración de 1/2 del extracto alcohólico. Determinando que en su composición química el grupo alifático y éster anhidrato interfieren en el crecimiento bacteriano. Además de contener flavonoles, antocianinas, estilbeno (resveratrol), ácidos fenólicos y galatos que se distribuyen ampliamente en semillas de uva.

Oikeh et al²¹ (Nigeria, 2016) investigaron la actividad antimicrobiana en diferentes concentraciones, el jugo de uva sobre *Staphylococcus aureus*. Usaron el extracto de fruta fresca, el cual fue liofilizado y el concentrado obtenido se conservó a 4°C en recipientes herméticos, para el cultivo usaron agar Mueller-Hinton. Se usó concentrado de 25 y 12.5 ug/ml de la fruta, registrando una zona de inhibición de 10 mm, considerado buen efecto bactericida por la composición fitoquímica: presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, glucósidos cardíacos y azúcares reductores.

Alarcón²² (Ecuador, 2016) comparó la acción antibacteriana del extracto etanólico de *Vitis vinífera* a concentraciones de 100%, 50%, 25% en cultivos de *S. mutans* con clorhexidina en concentración de 0,12%. La clorhexidina y el agua destilada como control positivo y control negativo respectivamente. Usaron agar Mueller Hinton con suplemento del 5% de sangre. Encontraron que el halo de inhibición del extracto de *Vitis* al 100% fue de 4,35mm, para clorhexidina al 0.12% fue 8,7 mm. Concluyen que no hubo diferencia significativa entre los productos estudiados.

Yadav et al²³ (India, 2015) estudiaron la acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistentes a antibiótico con extractos de cáscara de uva negra combinada de modo individual con metanol, etanol, acetona y agua. Evidenciaron que el extracto de metanol poseía una alta actividad antibacteriana con zona máxima de inhibición de 22 mm y el extracto con etanol mostró 10 mm. Se encontró que el crecimiento de especies bacterianas se inhibe significativamente ($P < 0.05$) con todos los extractos solventes. Se debe a que los polifenoles penetran la membrana celular semipermeable donde reaccionan con el citoplasma y proteínas celulares, contienen una mayor cantidad de dímeros y trímeros de (-) epicatequina que poseen mayor efecto antimicrobiano; los taninos inhiben enzimas microbianas extracelulares. Además, determinan que los polifenoles con máxima extracción de antocianinas son más solubles en metanol que en agua.

Shrestha et al²⁴ (Asia, 2012) estudiaron el efecto antibacteriano del extracto de semilla de *Vitis vinifera* en cultivos de *Staphylococcus aureus* en agar Mueller Hinton, evidenciaron 12.5 mm de halo de inhibición para el extracto y el control positivo de eritromicina al 4% mostró una zona de inhibición media de 43 mm. Este estudio correlaciona que las propiedades antibacterianas se deben a los contenidos fenólicos (medida en equivalentes de ácido gálico) que se encuentran en la semilla que son parcialmente hidrófobos y se considera que interactúan con la pared celular bacteriana y las interfaces de los lipopolisacáridos al disminuir la estabilidad de la membrana.

Al-Habib et al²⁵ (Kuwait, 2010) determinaron la acción bactericida del extracto de la semilla de uva en cultivos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Se encontró que todas las cepas de MRSA eran sensibles al extracto. La inhibición completa de todas las cepas bacterianas analizadas se observó a concentración de 3 mg/ml de extracto de proantocianidinas de semilla de uva cruda, equivalente a 20,7 µg /ml de contenido de flavonoides. La actividad antibacteriana fue bactericida, con interrupción de la pared celular bacteriana observada en la microscopía electrónica de barrido y transmisión, porque el extracto de semilla de uva es rico en potentes polifenoles antioxidantes.

Parekh et al²⁶ (África, 2006) investigó el efecto antimicrobiano del extracto de *Vitis vinifera* en cultivos de *Staphylococcus aureus* en tres repeticiones al

comparar extracto etanólico y acuoso de *Vitis vinífera*. El extracto etanólico mostró 15 mm de diámetro, concluyendo que tuvo más efecto antibacteriano.

Gokturk et al²⁷ (Turquía, 2006) determinaron el efecto antibacteriano y contenido fenólico del extracto de *Vitis vinífera*, cultivaron el *S. aureus* en caldo de nutrientes, la concentración del extracto de semilla de uva siguió una secuencia de 10 %, 5%, 2.5%, 1%. Se mostró actividad bactericida contra *S. aureus* al final de las 48 h de exposición del extracto sobre la bacteria con una zona de inhibición de 25.67 ± 0.58 mm, esto se debió al alto contenido de compuestos fenólicos de 589.09 mg equivalente de ácido gálico por g en extractos de semilla de uva.

El género *Staphylococcus*, tiene 42 especies diferentes, algunas especies forman parte de la flora normal de la piel y mucosas del humano. La especie que coloniza piel y fosas nasales del humano con importancia clínica infecciosa es *Staphylococcus aureus*, son cocos Gram positivos de forma esférica que miden de 0.5 a 1.5 μ m de diámetro agrupados de modo irregular en racimo de uvas. Son inmóviles, no forman esporas y son resistentes al calor.²⁸

Elaboran catalasa, enzima que da la capacidad de desdoblar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno libre y agua. Es coagulasa positiva, crece en forma de colonias lisas, de bordes enteros, brillantes de color amarillento o dorada de 1 a 3 mm de diámetro en medio de cultivo después de 18 – 24 horas de incubación. Cuando crecen en medio de cultivo agar sangre tienen un halo de β -hemólisis.²⁸

En la pared celular contiene peptidoglucano que ofrece forma y estabilidad al patógeno, tiene acción endotoxina que participa en la fisiopatología de la infección. Contiene ácidos teicoicos, polímeros que ayudan en la unión del *Staphylococcus aureus* con la mucosa por medio de la fibronectina. Asimismo, la membrana citoplasmática está constituida de proteínas, hidratos de carbono, lípidos que se encargan de la barrera osmótica para la célula, además tiene una cápsula mucoide denominada slime que le da mayor capacidad de adherencia y aumenta su efecto antifagocítico.²⁸

Oxacilina es un fármaco betalactámico isoxazolil penicilina que tiene actividad sobre *Staphylococcus aureus*. El mecanismo de acción es a nivel de la pared

bacteriana, inhibe la síntesis de peptidoglucano. Esta inhibición se da por la gran capacidad que tiene de llegar y lograr unirse a las proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Las endopeptidasas, carboxilasas transpeptidasas, son enzimas que comprenden las PBPs y se encuentran involucradas en fases finales del ensamblaje de la pared bacteriana, además en el remodelamiento de la bacteria interfiriendo en su división y crecimiento. Este fármaco al ligarse a las PBPs inactiva a la bacteria y resulta en lisis de la pared bacteriana.⁸

La botánica sistemática incluye a la Vid (*Vitis vinífera* L.) en el grupo Cormofitas, perteneciente al tipo Fanerógamas y subtipo Angiospermas, de clase dicotiledóneas, perteneciente a la familia Vitaceae y género *Vitis*. El género *Vitis* está subdividido en 2 secciones (sección Muscadinia y sección Euvitis). En la sección Euvitis se encuentra la serie *Vitis vinífera*, única especie cultivable.²⁹

Es una planta trepadora y leñosa originaria de la zona mediterránea y Asia menor, pero actualmente es cultivada en todo el mundo. Conocida también como Vid o parra. Normalmente se opta porque su cultivo sea en climas templados y puede vivir por lo menos cien años. El fruto es la uva, tiene forma esférica y/o ovalada de 12 a 18 mm de diámetro. Compuesto de tres partes: mesocarpio, endocarpio y epicarpio.³⁰ Endocarpio es la capa fina que protege y envuelve a las semillas, cada baya contiene entre 0 a 4 semillas, ricas en taninos y aceites.²⁹ Las Semillas representan el 10 % del peso en el fruto.³¹

El epicarpio conocido también como hollejo, es la capa externa de la uva, representa el 7 % del total del fruto. Es membranoso y elástico, forma una capa denominada pruina que es serosa y fija las levaduras fermentadoras de mosto que a la vez protege al fruto. Su color y aroma está determinado por su estado fenológico; cuando se encuentra en fase herbácea toma coloraciones amarillas en variedades blancas, rosadas o violáceas tintas. El mesocarpio conocido como pulpa, simboliza la mayor parte del fruto en un 84%, de color translúcido, excepto de las variedades tintoreras. Es rica en ácidos (tartárico y málico), azúcares, agua, aromas.³¹

Dentro de su composición química, la acidez es un constituyente elemental en el sabor por el depósito de ácidos orgánicos. Los ácidos primordiales son el málico y el tartárico que representan el 90 % de acidez total; contiene pequeña

proporción de fumárico, succínico, cítrico, otros. Las bayas y hojas verdes son cuna de la síntesis de ácidos grasos, pero en el lapso de la maduración la síntesis de ácidos orgánicos va en descenso. Además, el clima posee un efecto sobre la acumulación y producción de ácidos orgánicos en la baya y en el Perú las plantaciones están distribuidas a lo largo de la costa, departamentos como La Libertad, Piura, Ica, Lima, Arequipa, durante el periodo de maduración en temperaturas altas hay una acidez menor y en zonas con temperatura baja la acidez es mayor³²

En el primer periodo de crecimiento una considerable parte de los azúcares se elaboran en las hojas y en el periodo de madurez en las bayas. Principalmente se encuentra fructosa y glucosa, de 150 a 250 gr por litro de jugo de bayas maduras. En el momento en que el fruto es verde la glucosa representa el 85 % del contenido de azúcar, la correlación de fructosa-glucosa al inicio de la maduración es alrededor de 1:1, post maduración sobresale la fructosa.³²

Los compuestos fenólicos, son una combinación de proantocianidinas (galato de catequina, galato de epicatequina, epicatequina) dan la pigmentación de la uva. Entre ellos se hallan taninos, flavonoides, antocianos y ácidos fenólicos. Los taninos se forman por los azúcares; en pulpa de bayas inmaduras hay una cantidad considerable, y en su madurez son hidrolizados generando descenso de su concentración en el fruto. Estos compuestos polifenólicos en *V. vinífera* han evidenciado ser responsables de las funciones antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales. Las proantocianidinas de *V. vinífera* tienen un papel como metabolitos de defensa contra herbívoros y patógenos.³³

Las semillas contienen taninos y ácidos fenólicos; la pulpa contiene ácidos fenólicos, algunos taninos, excepcionalmente antocianos y los hollejos contienen taninos, antocianos, ácidos fenólicos, un poco de flavonoides.³⁴ Las proantocianidinas tienen la capacidad de unirse a polisacáridos, alcaloides, proteínas, iones metálicos y radicales libre por actividad reactiva-antioxidante.³⁵

En los hollejos los taninos tienen mayor tamaño de polimerización y poseen epigallocatequina, mientras que los taninos de las semillas tienen un menor tamaño de polimerización y carecen de epigallocatequina, pero poseen

subunidades de (-)-epicatequina-3-galato a diferencia que los hollejos lo presentan débilmente.³⁵ La baya contienen bastantes metabolitos secundarios bioactivos, especialmente en los polifenoles como las catequinas, ácidos fenólicos, antocianinas.³⁶

El efecto antimicrobiano está dado por los compuestos polifenólicos, incluida las antocianinas, que ante una amplia gama de microorganismos poseen actividad antimicrobiana bactericida, fundamentalmente en la inhibición del crecimiento de agentes patógenos transmitidos. Las antocianinas son glucósidos que tienen azúcar; cuando no contienen azúcar se las denomina antocianinas.³⁷ En frutas y verduras de color púrpura, azul y rojo son los esenciales bioactivos para evitar infección microbiana. Exhiben acción antimicrobiana por diferentes mecanismos, como el daño celular inducido al destruir la pared celular, la membrana y la matriz intercelular.³⁸

Las antocianinas pueden llegar a ser potentes antioxidantes debido a su estructura. Tienen un alto poder reductor al prevenir o detoxificar procesos que generan radicales libres y muerte celular, por lo que están consideradas como protectoras de las plantas de daños producidos por especies reactivas de oxígeno.³⁹

Resveratrol es un compuesto que se produce en la piel y hojas de las uvas en respuesta a una infección o a un estrés inducido por herbicidas, fungicidas o luz UV. Va disminuyendo considerablemente durante la maduración del fruto de la uva.⁴⁰ Es una molécula activa redox que se une fácilmente con el cobre de iones de metales de transición y lo reduce y así genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que puede dañar moléculas vitales dentro de una célula como el ADN, proteínas y membranas, altera el estado redox dentro de una célula que conduce a efectos pleiotrópicos que podrían culminar en la muerte celular. Su metabolito piceatannol se unen a iones de cobre y generan ROS y dañan el ADN. El resveratrol inhibe una amplia gama de bacterias.⁴¹

III. METODOLOGÍA.

3.1. Tipo y diseño de investigación.

- Tipo de estudio: Básica.⁴²
- Diseño de investigación: Experimental con repeticiones múltiples con post prueba.⁴² (Anexo 01)

3.2. Variables y operacionalización. (ANEXO 02)

Independiente: Agente bactericida.⁴³

1. No farmacológico: extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera*.
2. Farmacológico: oxacilina a concentración de 1 µg.

Dependiente: Efecto bactericida⁴⁴, según la técnica de Kirby Bauer.⁴⁵

1. Si efecto bactericida: halo de inhibición >13 mm.
2. No efecto bactericida: halo de inhibición < 13 mm.

3.3. Población, muestra y muestreo.

Población: Los cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Criterios de inclusión:

- Cultivos jóvenes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (con menos de 24 horas de cultivo).
- Frutos frescos y sanos.

Criterios de exclusión:

- Cultivos contaminados.
- Cultivo que no crecieron.
- Frutos fermentados, fumigados con insecticidas y herbicidas.

Muestra: El tamaño se determinó mediante la fórmula estadísticas para comparación de dos medias.⁴² (Anexo 03).

Muestreo: Probabilístico, aleatorio simple.⁴²

Unidad de análisis: Cada cultivo de *staphylococcus aureus* tratado y sujeto a experimentación.

Unidad muestral: Cada placa Petri, conteniendo el cultivo de la cepa en estudio.

3.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos.

Técnica: Observación directa del crecimiento de las colonias de bacterias en placas Petri y los halos de inhibición.⁴⁶

Instrumento: Se elaboró una ficha de campo para la recolección de datos por el investigador, donde fueron registrados los diámetros de halos de inhibición según la dilución del extracto etanólico de la semilla de *Vitis vinífera* y el fármaco utilizado. (Anexo 04)

Validación y confiabilidad del instrumento: La ficha de campo fue revisada por especialistas.⁴⁶ Apoyaron tres profesionales (médico Internista, médico general y biólogo) así aseguraron que la ficha de campo recoja la información apropiada para el estudio. (Anexo 05)

3.5. Procedimiento. (ANEXO 06)

- a. La planta a usar fue identificada en el Herbarium Truxillense Hut de la Universidad Nacional De Trujillo. (*Vitis vinífera*).
- b. Técnica para recolección, conservación de la semilla de *Vitis Vinífera*.¹⁸
- c. Procedimiento de obtención del extracto etanólico de la semilla de *Vitis Vinífera*.⁴⁷
- d. Técnica de la siembra del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en medio Mueller-Hinton y aplicación de discos embebidos con extracto etanólico de *Vitis vinífera*.⁴⁴

3.6. Método de análisis de datos.

Los datos obtenidos fueron tabulados en Excel 2016, posteriormente se analizaron en el programa SSPP versión 26.0 para Windows. Se determinó la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas, después se trabajó el análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de 0.05, para determinar si existe diferencia significativa entre los promedios de los halos de inhibición de los grupos analizados. Una vez hechas las pruebas respectivas se aplicó una prueba post ANOVA de Tukey para determinar cuál es el mejor tratamiento y si la combinación de extracto etanólico concentrado de *Vitis vinífera* con oxacilina tiene mayor eficacia, con lo que se demostraría el efecto sinérgico.⁴²(Anexo 07)

3.7. Aspectos éticos.

Se tuvo en cuenta el Manual de procedimientos de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos del Ministerio de Salud de la Norma Técnica N° 18.⁴⁸ (Anexo 08) Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica. Ley N° 26839.⁴⁹ (Anexo 09)

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Datos descriptivos del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* y oxacilina a 1 µg. sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

		95% del intervalo de confianza para la media					
	N	Media (mm)	Desv. Desviación	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
EEVV		34,60	1,57762	33,4714	35,7286	32,00	37,00
EEVV+OXA	10	43,100	1,19722	42,2436	43,9564	41,00	45,00
OXA	10	43,600	1,57762	42,4714	44,7286	41,00	46,00

Fuente: Reporte SPSS Vs 26

EEVV: Extracto etanólico de *Vitis vinífera*

EEVV + OXA: Extracto etanólico de *Vitis vinífera* + Oxacilina

OXA: Oxacilina

Tabla 2. Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* y oxacilina a 1 µg. sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	511,667	2	255,833	119,71 4	0,000
Dentro de grupos	57,700	27	2,137		
Total	569,367	29			

Fuente: Tabla 1 y reporte SPSS V.s 26

p = 0.000

EEVV: Extracto etanólico de *Vitis vinífera*

EEVV + OXA: Extracto etanólico de *Vitis vinífera* + Oxacilina

OXA: Oxacilina

Tabla 3. Análisis post ANOVA de Tukey, del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* y oxacilina a 1 µg. sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

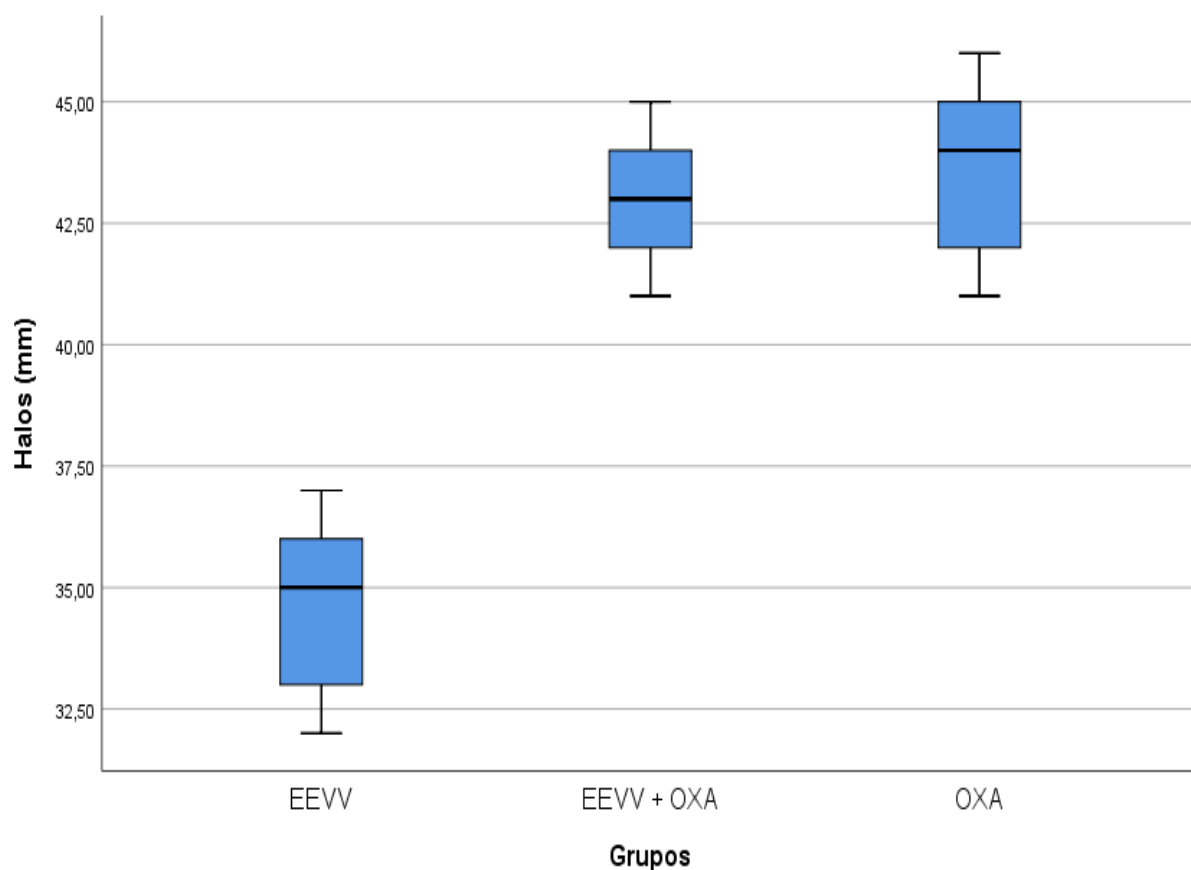
HSD Tukey ^a			
Grupos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
EEVV	10	34,6000	
EEVV+OXA	10		43,1000
OXA	10		43,6000
Sig.		1,000	0,727

Fuente: tabla 1 y reporte SPSS V.s 26

EEVV: Extracto etanólico de *Vitis vinífera*

EEVV + OXA: Extracto etanólico de *Vitis vinífera* + Oxacilina

OXA: Oxacilina



Fuente: tabla 01 y reporte SPSS V.s 26

Figura 1: Diagrama de Cajas y bigotes, del efecto bactericida según las medidas de halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* y oxacilina a 1 µg. sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

EEVV: Extracto etanólico de *Vitis vinífera*

EEVV + OXA: Extracto etanólico de *Vitis vinífera* + oxacilina

OXA: Oxacilina

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se evalúa la sinergia bactericida del extracto etanólico concentrado de *Vitis vinífera* con oxacilina a 1 µg. sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in vitro; se realizaron un total de 10 repeticiones de cada tipo de concentración, como resultados se obtuvo lo siguiente:

En la tabla 1, se muestran las medias de los halos de inhibición sobre cepas de *S. aureus*, por cada grupo de experimentación, evidenciándose que los halos de inhibición del EEVV concentrado muestran una media de inhibición de 34,60 mm (DS: $1,57762 \pm 0,49889$, IC 95% 33,4714 - 35,7286, con un rango de 32,00 a 37,00 mm), según el CLSI esta concentración tiene efecto inhibidor del crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (>13mm). El halo de inhibición con OXA es de 43,60 mm (DS: $1,57762 \pm 0,49889$, IC 95% 42,4714 - 44,7286, con un rango de 41,00 a 46,00 mm). La combinación de EEVV más OXA evidenció una inhibición de 43,10 mm (DS: $1,19722 \pm 0,37859$, IC 95% 42,2436 - 43,9564, con un rango de 41,00 a 45,00 mm).

En la Tabla 2, se muestra los resultados de la prueba paramétrica, del análisis de varianza (ANOVA) obteniéndose que las varianzas de los grupos evaluados, fueron homogéneas. Se halló diferencias entre los promedios de los halos de inhibición ($p:0.000$).

La Tabla 3 presenta el análisis post ANOVA de Tukey, donde se observa que no existe diferencia entre OXA y la combinación del EEVV más OXA, lo que también se aprecia en la Figura 1.

Los resultados del estudio evidenciaron mayores halos de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* sola y combinada con oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Algo similar evidencian, Gokturk et al²⁷ (25.67 ± 0.58 mm), Alkhulaifi et al¹⁹ (20mm), Kulastic et al¹³ quien empleó extracto etanólico (al 50, 60 y 70%) y obtuvo halos de inhibición de 12 mm, 16mm, 25 mm. Yadav et al²³ para *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos con el extracto metanólico de la cáscara de uva (22 mm) y el extracto etanólico (10 mm).

Otros autores evidencian valores menores como Abdul et al ²⁰ quienes emplearon extractos de semilla de la uva obteniendo una inhibición para *Staphylococcus aureus* de 17 mm a concentración de 1 y 12 mm para concentración de 1/2 del extracto alcohólico. Pavic et al ¹⁵ analiza el efecto antibacteriano de la cáscara de uva (13.75 ± 1.26). Abouzeed et al ¹⁶ trabajaron con pasas de *Vitis vinífera* y observaron que el extracto acetónico de pasas exhibió actividad contra *Staphylococcus aureus* (14 mm). Divya¹⁷ (3.1 mm a concentración de 170 ppm de AgNPs), Oikeh et al ²¹ con jugo de uva al 25 y 12.5 ug/ml (10 mm), Shrestha et al²⁴ extracto de semilla de *Vitis vinífera* *Staphylococcus aureus* 12.5 mm. Parekh et al ²⁶ (15 mm).

Por otra parte, otros investigadores también encontraron efecto bactericida sobre otras bacterias similares; así Defaz¹⁴ comparando el extracto de cáscara de uva con clorhexidina al 12 % sobre *streptococcus mutans* obtuvo al 75% 9mm, y al 50% 8 mm. Caicedo¹⁸ trabajó con extracto acuoso de semilla de uva al 100% sobre *streptococcus mutans* ATCC 35668, obteniendo un halo de 11 mm y Alarcón²² con extracto etanólico (100, 50, 25%) en cultivos de *S. mutans* obtuvo: 100%: 4,35mm, para clorhexidina al 0.12% fue 8,7 mm) y no establece diferencias significativas.

Algunos autores consideran que la actividad antibacteriana podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos, ácido gálico y la presencia de tres grupos hidroxilo y el sustituyente del anillo de benceno.¹³ Observaron que la defoliación inmediatamente después de la floración aumenta la concentración fenólica total obteniéndose mayor concentración de antocianinas que contribuye a mejorar la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.¹⁵ Se encuentran también compuestos antibacterianos, antioxidantes y fenólicos en los extractos de pasas de *Vitis vinífera*.¹⁶ El efecto antibacteriano y contenido fenólico del extracto de *Vitis vinífera*, se debe al alto contenido de compuestos fenólicos, equivalente al ácido gálico encontrados en la semilla de uva.²⁷

El efecto bactericida se ejerce por la interrupción de la pared celular bacteriana al ser el extracto de semilla de uva rico en potentes polifenoles antioxidantes.²⁵ Abdul et al²⁰ encontraron que el grupo alifático y éster anhídrido interfieren en el crecimiento bacteriano, al contener flavonoides, antocianinas, estilbeno

(resveratrol), ácidos fenólicos y galatos contenidos en mayor concentración en la pepa de la uva. Así mismo Alkhulaifi et al¹⁹ también encuentra flavonoides fenólicos biológicamente activos que suprimen los factores de virulencia bacteriana, formación de biopelículas, reduce la adhesión de los ligandos del hospedador, neutraliza las toxinas bacterianas y el ácido gálico ejerce efecto inhibidor bacteriano al modificar las membranas bacterianas irreversiblemente. Indica que probablemente las diluciones con alcohol facilitan la extracción de polifenoles a diferencia que los extractos acuosos. Sugiere que la actividad antibacteriana proviene de la interacción sinérgica entre los metabolitos secundarios de compuestos fenólicos.

Shrestha et al²⁴ relacionan el contenido fenólico (equivalentes de ácido gálico en la semilla) que son parcialmente hidrófobos, que podrían estar interactuando sobre la pared celular bacteriana y las interfaces de los lipopolisacáridos disminuyendo estabilidad de la membrana.

En algunas investigaciones se considera que los polifenoles solubles en metanol (dímeros y trímeros de (-) epicatequina) reaccionan con el citoplasma y proteínas bacterianas al penetrar la membrana semipermeable celular, y que los taninos inhiben enzimas microbianas extracelulares sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a antibiótico.²³

Otros autores refieren que la capacidad antibacteriana es dependiente de la concentración de componentes polifenólicos (mayor concentración en la semilla)^{18, 14} sobre cepas de *S. mutans*. Abouzeed et al¹⁶ considera a catequina, rutina y quercetina. El efecto bactericida para Oikeh et al²¹ se debe a alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, glucósidos cardíacos y azúcares reductores, ejercen actividad sobre *S. aureus*.

El efecto se debe a los compuestos fenólicos de la semilla que son una combinación de proantocianidinas (galato de catequina, galato de epicatequina, epicatequina) que corresponden a taninos, poseen subunidades de (-)-epicatequina-3-galato³⁵ y los compuesto flavonoides, antocianos de la *Vitis vinífera*³⁷ además de ser bactericidas, también tiene funciones antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales.³³

Las proantocianidinas tienen un papel como metabolitos de defensa contra herbívoros y patógenos.³³ con capacidad de unirse a polisacáridos, alcaloides (como lo refieren Oikeh et al²¹), proteínas, iones metálicos (azufre y fósforo como lo refiere Divya¹⁷) y radicales libres con actividad reactiva-antioxidante.³⁵ lo que explica la capacidad de ejercer efecto sobre el *S. aureus* porque en su pared celular contiene peptidoglucano que ofrece forma y estabilidad al patógeno, la membrana citoplasmática está constituida de proteínas, hidratos de carbono, lípidos ²⁸ que son alterados cuando entran en contacto con el extracto etanólico de *Vitis vinífera*.

Las frutas de color púrpura contienen los bioactivos esenciales para evitar infección microbiana, su acción radica en el daño celular inducido al destruir la pared celular, la membrana y la matriz intercelular.³⁸ en el caso de la variedad de uva Gross Colman usada en este estudio que es de color oscura indica la presencia de bioactivos esenciales para acción antibacteriana.

VI. CONCLUSIONES

1. El halo de inhibición obtenido con el extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera*, evidencia efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, según el CLSI (>13 mm).
2. La combinación del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* con oxacilina, muestra efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, similar a los hallados con oxacilina.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con diferentes variedades de *Vitis vinífera* para determinar su efecto bactericida.
- Evaluar el efecto antibacteriano con otros componentes estructurales de *Vitis vinífera*.
- Investigar los principios activos de los componentes de la *Vitis vinífera* según variedad y comprobar su efecto bactericida.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de *Vitis vinífera* en modelos biológicos.

REFERENCIAS

1. Saavedra J, Santos M, González F, Hernández T, Navarro M. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. AEP. [Internet]. [Citado el 01 de feb. 2020]; (17):160-175. Disponible desde: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/piel.pdf>
2. Moyanoc M, Peuchota A, Giachettid A, Morenoa R, Cancellaraa A, Falaschia A, et al. Infecciones de piel y partes blandas en pediatría: consenso sobre diagnóstico y tratamiento. Arch Argent Pediatr. [Internet]. 2014; [Citado el 01 de feb. 2020]; 112(2):183-191. Disponible desde: https://www.sap.org.ar/uploads/consensos/consensos_infecciones-de-piel-y-partes-blandas-en-pediatria-consenso-sobre-diagnostico-y-tratamiento-parte-2-celulitis-ectima-y-ectima-gangrenoso-celulitis-necrotizantes-consideraciones-finales-16.pdf
3. Paganini H. Infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente proveniente de la comunidad, nuevo desafío para los pediatras. Medicina Infantil. [Internet]. 2007 [Citado el 01 de feb. 2020]; XIV (4):292-95. Disponible desde: http://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2007/xiv_4_292.pdf
4. Jameson J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Loscalzo J. Harrison Principios de Medicina Interna. 20ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 2018.
5. Consenso nacional para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones de piel, partes blandas y soma en pediatría. [Internet] [Citado el 01 de feb. 2020]. Disponible desde: <http://files.sld.cu/ucipediatria/files/2012/05/consenso-nacional-para-el-diagnostico-y-tratamiento-de-las-infecciones-de-piel-hueso-y-partes-blandas4.pdf>
6. Instituto Nacional de Seguridad e higiene en el trabajo. *Staphylococcus aureus*. [Internet]. BDataBio. 2012. [Citado el 01 de feb. 2020]. Disponible desde: <https://studylib.es/doc/3834947/nueva-ventana-staphylococcus-aureus--pdf--466-kbytes>

7. Valderrama S, Cortez J, Caro M, Andrade L, Osorio J, Gualtero S, Et al. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y manejo de las infecciones de piel y tejidos blandos en Colombia. Revista Infecto. [Internet]. 2019 [Citado el 01 de feb. 2020]. p 318-320. Disponible desde: <https://www.docsity.com/es/guias-europeas-2015-2018-2/4964674/>
8. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M, Portoles A. Farmacología Básica y Clínica. 18ava ed. Madrid: Editorial médica Panamericana; 2008.
9. Badet C. Actividad antibacteriana de las semillas de uva (*Vitis vinífera*, *Vitis rotundifolia*). Sciencedirect. [Internet]. 2011. [Citado el 01 de feb. 2020]; p 545-552. Disponible desde: <https://www.lens.org/lens/scholar/article/036-608-702-656-939/main>
10. Santos M, Alonso M, Ladero I, Martín A. Plantas medicinales españolas. *Vitis vinífera* l. Subsp. *Vinífera* (vitaceae). [Internet]. Ediciones Universidad de Salamanca. Stud. Bot. [Internet]. 2005 [Citado el 01 de feb. 2020]; (24): 55-64. Disponible desde: https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/56391/SB2005_V24_P55.pdf?sequence=1&isAllowed=y
11. Escalona L, Tase A, Estrada A, Almaguer M. Uso tradicional de plantas medicinales para el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. Rev Cubana de Plantas Medicinales. [Internet]. 2015 [Citado el 01 de feb. 2020]; 20(4): 429-439. Disponible desde: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v20n4/pla07415.pdf>
12. Mejía J, Carrasco E, Miguel J, Flores S. Conocimiento, aceptación y uso de medicina tradicional peruana y de medicina alternativa/complementaria en usuarios de consulta externa en Lima Metropolitana. Rev Perú Med Integrativa. [Internet]. [Citado el 01 de feb. 2020]; 2017; 2(1):47-57. Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/319660863_Conocimiento_aceptacion_y_uso_de_medicina_tradicional_peruana_y_de_medicina_alternativa_complementaria_en_usuarios_de_consulta_externa_en_Lima_Metropolitana

13. Kulastic A, Dillwyn S, Pragalyaasheree M, Troutchelvame. Evaluación de las propiedades antibacterianas y antioxidantes de diferentes variedades de semillas de uva (*Vitis vinífera* L.) IJSTR. 2020; [Citado 04 oct. 2020]; 9(03): 4116-4120. ISSN 2277-8616.
14. Defaz O. Efecto antimicrobiano del extracto de cáscara de uva (*Vitis vinífera*) y cáscara de guanábana (*annona muricata*) en comparación con la clorhexidina al 12 % sobre *Streptococcus mutans*. Estudio comparativo in vitro. [Tesis de odontóloga] Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2019. [Citado 27 de feb. 2020]. Disponible desde: <http://200.12.169.19:8080/bitstream/25000/19567/1/T-UCE-0015-ODO-225.pdf>
15. Pavic V, Kujundzic T, Kopic M, Jukic V, Braun U, Schwander F, Drenjancevic M. Efectos de la defoliación en las concentraciones fenólicas, la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos de piel de uva de las variedades Blaufränkisch y Merlot (*Vitis vinífera* L.). Moléculas. [Internet]. 2019 jul [Citado 27 de feb. 2020]; 24 (13). PMID 31277303. Disponible desde: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=75232e7a-2a3d-4f69-be4e-0714faf23ff8%40pdc-v-sessmgr03>
16. YAbouzeed Y, Zgheel F, Elfahem A, Almagarhe M, Dhawi A, Elbaz A, et al. Identificación de compuestos fenólicos, actividades antibacterianas y antioxidantes de extractos de pasas. Open Vet J. [Internet]. 2018 dic [Citada: 2020 Feb 27]; 8(4): 479–484. NCBI; PMID 30775288. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356098/>
17. Divya R, Supraja N, David E. Síntesis y caracterización de ZnONP del extracto de cáscara de *Vitis vinífera* y su eficacia antimicrobiana. Advancements Bioquív Avallab. [Internet]. 2018 dic. [Citado 22 mar 2020]; 2(2):129-136. Disponible desde: <https://crimsonpublishers.com/downloadPdf.php?folder=abb&file=ABB.000535>
18. Caicedo. M. Efecto antimicrobiano del extracto de semilla de uva (*vitis vinífera*) sobre cepas de *streptococcus mutans*: estudio in vitro. [Proyecto

- de investigación para obtención de título de Odontólogo]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2017. [Citado 27 feb 2020]. Disponible desde: <http://200.12.169.19/bitstream/25000/12746/1/T-UCE-0015-767.pdf>
19. Alkhulaifi M, Alfarraj D, Moubayed N. Actividad antibacteriana in vitro de extractos de semillas de uva roja en algunas bacterias patógenas humanas importantes. JAM. [Internet]. 2017 jul [Citado 27 feb 2020]; (2):78-84. ResearchGate; ISSN 2349-7785. Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/320287380_In_vitro_Antibacterial_Activity_of_Red_Grape_SeedExceptions_on_some_Important_Human_Pathogenic_Bacteria
 20. Abdul K, Zuhair S, Sawsan I. Análisis químico y actividad antibacteriana de uva (*Vitis vinífera*) extractos de semillas. Worls J Exp Biosci; 4(1): 58-61. ISSN 2313-3937.
 21. Oikeh E, Omoregie E, Oviasogie F, Oriakhi K. Actividades fitoquímicas, antimicrobianas y antioxidantes de diferentes concentrados de jugo de cítricos. Food Science and Nutrition [Internet]. 2015 Jul [Citado 5 mar 2020]; 4(1): 103–109. Wiley Periodicals, Inc; Doi 10.1002/fsn3.268. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/fsn3.268>
 22. Alarcón J. Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Vitis vinífera* (uva) sobre el *Streptococcus mutans*. [Trabajo para obtener el título de Odontólogo]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2018. [Citado 05 mar 2020]. Disponible desde: <http://200.12.169.19:8080/bitstream/25000/15643/1/T-UCE-0015-ODO-002.pdf>
 23. Yadav D, Kumar A, Kumar P, Mishra D. Propiedades antimicrobianas de los extractos de cáscara de uva negra (*Vitis vinífera* L.) contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos y mohos productores de toxinas. Indian J Pharmacol. [Internet]. 2015 Nov [Citado 05 mar 2020]; 47 (6): 633-667. PMC; PMID 26729960. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689022/>

24. Shrestha B, Srithavaj M, Thaweboon S, Thaweboon B. Efectos antimicrobianos in vitro del extracto de semilla de uva en la microflora periimplantitis en implantes craneofaciales. Asiático Pac J Trop Biomed. [Internet]. 2012 Oct [Citado 05 mar 2020]; 2 (10): 822–825. PMC: PMID 23569854. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609222/>
25. Al-Habib A, Al-Saleh E, Majeed A, Afzal M. Efecto bactericida del extracto de semilla de uva sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). J. Toxicol. Sci. [Internet]. 2010 Feb [Citado 05 mar 2020]; 35(3): 357-364. Disponible desde: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/35/3/35_3_357/article#author-information-wrap
26. Parekh J, Chanda S. Actividades antimicrobianas in vitro de extractos de *Launaea procumbens* Roxb. (Labiateae), *Vitis vinífera* L. (Vitaceae) y *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). African Journal of Biomedical Research. [Internet]. 2006 [Citado 10 mar 2020]; 9(2): 89 -93. AJOL; Doi: 10.4314/ajbr.v9i2.48780. Disponible en: <https://www.ajol.info//index.php/ajbr/article/view/48780>
27. Gokturk N, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. Determinación de los efectos antibacterianos y el contenido fenólico total de los extractos de semillas de uva (*Vitis vinífera* L.). International Journal of Food Science and Technology. [Internte]. 2006 jul [Citado 06 mar 2020]; 41, 799–804. Ifst; Doi:10.1111/j.1365-2621.2005.01095.x. Disponible desde: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2005.01095.x>
28. Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. España. Marge médica books: 2009.
29. Asensio M. caracterización de variedades de *Vitis vinífera* L. cultivadas en Extremadura, mediante estudios morfológicos, agronómicos y bioquímicos. [Tesis Doctoral] Madrid: Universidad Politécnica De Madrid; 2000.

30. Mezarina L. Efecto hipolipidémico de la cáscara pulverizada de *Vitis Vinífera* variedad Pinot Noir (Uva Borgoña) en ratas con Hiperlipidemia inducida. [Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Nutrición] Perú: Universidad Mayor De San Marcos; 2015.
31. Cutipa J. Ácido abscísico y Etephon en la coloración de uva de mesa cv. 'Red Globe' en la zona alta Valle – Ica. [Tesis para bachiller]. Perú: Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa; 2013.
32. Gonzales P. Optimización del uso de reguladores de crecimiento para el cultivo in vitro de tres cultivares portainjertos en *vitis vinífera* L. (Vid) Para uso en la industria pisquera: Harmony, Paulsen y Freedom. [Tesis para optar el título de biólogo]. Perú: Universidad Agraria La Molina; 2017.
33. Calapai G, Bonina F, Bonina A, Rizza L, Mannuci C, Arcoraci V, et al. Un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, sobre los efectos de un extracto de *Vitis vinífera* en la función cognitiva en adultos mayores sanos. Front Pharmacol. [Internet]. 2017 Oct [Citado 04 abr 2020]; 8:776. PMC; PMID 29163162. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5671585/>
34. Reynier, A. Manual de viticultura. 6ta ed. Mundi-Prensa. Madrid; 2012. p.407.
35. Gastaminza J, Lizama V. Composición química de hollejos y pepitas de uvas cabernet Sauvignon en relación a diferentes niveles de riego. Caracterización del grado medio de polimerización de proantocianidinas utilizando cromatografía líquida de alta presión. Universidad politécnica de valencia. España. [Internet]. [Citado 04 abr 2020]. Disponible desde: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28126/Trabajo%20Fin%20de%20master%2C%20Joaqu%C3%ADn%20Gastaminza%20Amodeo.pdf?sequence=1>
36. Riedel H, Akumo D, Min N, Smetanska I, Neubauer F. Investigación de ácidos fenólicos en cultivos en suspensión de *Vitis vinífera* estimulados con indanoil-isoleucina, *N*-linol-L-glutamina, malonil coenzima A y saliva de insectos. Metabolites. [Internet]. 2012 Feb [Citad 4 abr 2020]; 2 (1):

- 165-177. PMC; PMID 24957372. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3901193/>
37. Taiz L, Zeiger E. fisiología vegetal. 3ra ed. USA: Universitat Jaume-I; 2006 (1)551.
38. Eng H, Azlan A, Teng S, Lim M. Antocianidinas: pigmentos coloreados como alimentos, ingredientes farmacéuticos y los posibles beneficios para la salud. Food Nutr Res. [Internet]. 2017 Ago [Citado 04 abr 2020]; 61 (1). PMC; PMID 28970777. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613902/>
39. Castañeda B, Inducción de antocianinas y capacidad antioxidante por oligogalacturónidos en uvas de mesa cv. 'Flame Seedless'. [Tesis para el Grado de Maestría en Ciencias]. Sonora. Centro de investigación en alimentación y desarrollo; 2010.
40. Fuente L. Estudio de la capacidad antioxidante de los polifenoles del vino y sus aplicaciones biológica-preventivas. [Tesis de Grado en Biotecnología]. Universidad Europea: Europa; 2014. [Citado 20 abr 2020]. Disponible desde: <http://digital.csic.es/handle/10261/127146>
41. Subramanian M, Goswami M, Chakraborty S, Jawali N. La inhibición inducida por el resveratrol de *Escherichia coli* se produce a través de la oxidación de la membrana e independiente de la generación de especies reactivas de oxígeno difusibles. Redox Biol. [Internet]. 2014 Jun [Citado 4 abr 2020]; 2: 865–872. PMC; PMID 25009788. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4087184/>
42. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
43. Calvo J, Martínez L. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. [Internet]. Elsevier. España. 2009 Enero 27 (1): 44-52. [Citado 31 abr 2020]. Disponible desde: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-antimicrobianos-S0213005X08000177>

44. Patel J, Cockerill F, Bradford P, Eliopoulos G, Hindler J, Jenkins S. Estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad de disco antimicrobiano. CLSI. 12ava ed. 2015 Enero 35(1): 96.
45. Bernal M, Guzmán M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica Kirby Bauer.
46. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed. México. Limusa; 2006.
47. Carrión A, García C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. [Tesis para obtener el Título de Bioquímica y Farmacéutica]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010.
48. Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. [Internet]. 3ra ed. Perú: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2005. [Citado 03 may 2020]. Disponible desde: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
49. Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica. [Internet]. Ley N° 26839. Perú. [Citado 15 sep 2020]. Disponible desde: <https://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-conservacion-aprovechamiento-sostenible-diversidad-biologica#:~:text=Ley%20N%C2%B0%2026839%20.,Sostenible%20de%20la%20Diversidad%20Biol%C3%B3gica.&text=La%20presente%20ley%20norma%20la,la%20Constituci%C3%B3n%20Pol%C3%ADtica%20del%20Per%C3%BA.>

ANEXOS

ANEXO 01

Diseño de investigación

- RG1	X1	O1
- RG2	X2	O2
- RG3	X3	O3
- RG4	X4	O4

Dónde:

RG1: Grupo tratado con el extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera*.

RG2: Grupo estándar tratado con oxacilina a 1 µg (control positivo).

RG3: Grupo expuesto a sinergia de extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* con oxacilina a 1 µg.

RG4: Grupo estándar tratado con solución salina (control neutro)

O: Las observaciones son posteriores al estímulo porque no hay medición basal.

ANEXO 02

Matriz de variables y operacionalización

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO DE VARIABLE
Variable independiente Agente bactericida	<p>Compuesto que ejerce una acción letal para la bacteria.⁴³</p> <p>Tratamiento no farmacológico con extracto etanólico de la semilla de <i>Vitis vinífera</i></p> <p>Tratamiento farmacológico con oxacilina</p> <p>Combinación de ambos tratamientos</p>	<p>Se dividió en 4 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Extracto etanólico concentrado de la semilla de <i>Vitis vinífera</i> y oxacilina a 1 µg. 2. Extracto etanólico concentrado de la semilla de <i>Vitis vinífera</i>. 3. Oxacilina 1 µg. 4. Solución salina. 	<p>RG1</p> <p>RG2</p> <p>RG3</p> <p>RG4</p>	Cualitativa nominal
Variable dependiente Efecto bactericida	<p>Mecanismo de interferencia del crecimiento microbiano, afectando la síntesis de la pared bacteriana, membrana citoplásmica, e inhibición de la síntesis de ADN.⁴³</p>	<p>Se evaluó a través del diámetro del halo de inhibición CLSI⁴⁴ y mediante la técnica Kirby Bauer.⁴⁵</p> <p>Resistente <10 mm.</p> <p>Intermedio 11-12mm.</p> <p>Sensible >13mm.⁴⁴</p>	<p>Con efecto bactericida ≥ 13 mm</p> <p>Sin efecto bactericida ≤13mm.</p>	Cualitativa nominal

ANEXO 03

Tamaño de muestra

Fórmula utilizada: Fórmula estadística para comparación de dos medias.⁴²

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{(\underline{X}_1 + \underline{X}_2)} \times 2 \sigma^2$$

DONDE:

$Z_{\alpha/2}$: 1.96 (Nivel de confianza del 95 %)

Z_{β} : 0.84 (Potencia de prueba del 80 %)

\underline{X}_1 : 13 mm⁴⁷

\underline{X}_2 : 25.67 mm²⁷

σ^2 : 0.58²⁷

n: 0.06

Se trabajará con 10 repeticiones, a criterio del autor y sugerencia de los especialistas.

ANEXO 04

Instrumento: ficha de recolección de datos: diámetros de halos de inhibición según dilución del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinífera* y el fármaco utilizado.

Placas con cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (N° de repeticiones)	Periodo de tiempo	Agentes antibacterianos y controles			
		Extracto etanólico de semilla concentrado de <i>vitis vinífera</i> .	Extracto etanólico de semilla concentrado de <i>Vitis vinífera</i> con oxacilina 1 µg.	Oxacilina 1 µg (Gold estándar)	Solución salina (NaCl 9%)
		ZONA DE INHIBICIÓN EN mm			
1	24 horas	37	44	45	0
2	24 horas	35	43	41	0
3	24 horas	35	45	44	0
4	24 horas	32	44	42	0
5	24 horas	36	43	44	0
6	24 horas	34	42	43	0
7	24 horas	33	41	44	0
8	24 horas	33	43	45	0
9	24 horas	35	44	46	0
10	24 horas	36	42	42	0
Promedio		34,60	43,100	43,600	0

ANEXO 05

Validación del instrumento

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:


.....

.....

.....

Gracias, por su generosa

colaboración

Apellidos y nombres	Polo Gamboa Jaime Abelardo
Grado Académico	Magister
Mención	Docencia Unidisciplinaria
Firma	 Jaime A. Polo Gamboa MICROBIOLOGO C.B.P. 0551

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ITEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas			X	
Halos de inhibición de oxacilina 1µg.			X	
Halo de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de vitis vinífera.			X	
Halo de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de vitis vinífera y oxacilina 1µg.			X	
Solución salina			X	

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado


Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Chávez Rimarachin Manuel
Grado Académico	Maestro
Mención	Medicina
Firma	 Manuel B. Chávez Rimarachin MEDICINA INTERNA CMP. 33634 RME. 19588

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ITEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas			X	
Halos de inhibición de oxacilina 1µg.			X	
Halo de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de vitis vinífera.			X	
Halo de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de vitis vinífera y oxacilina 1µg.			X	
Solución salina			X	

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

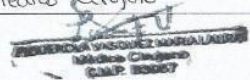
Recomendaciones:

.....

.....

.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Figueroa Vasquez Mónica Laura
Grado Académico	Médico Cirujano
Mención	Médico Cirujano
Firma	

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

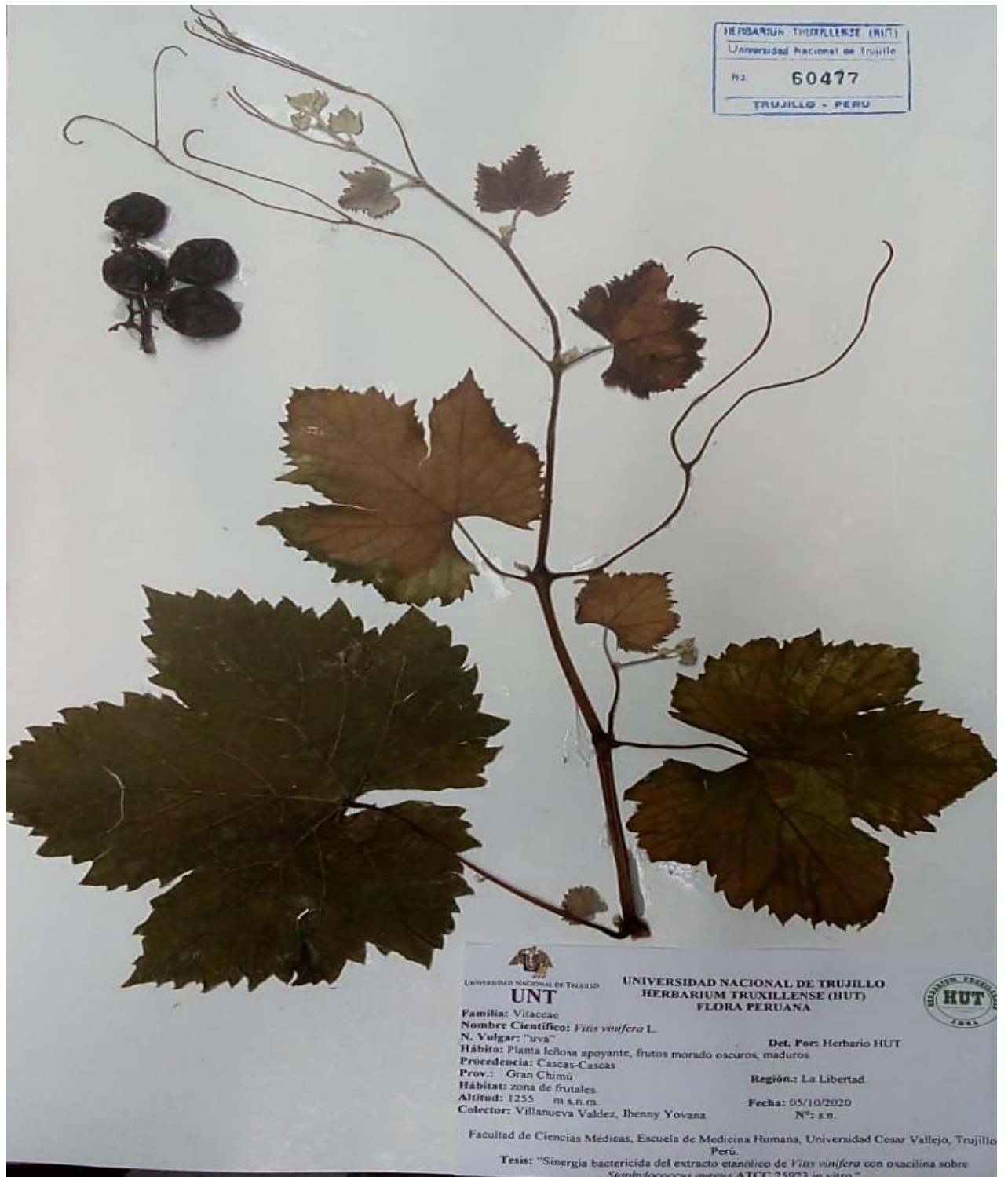
ITEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas				
Halos de inhibición de oxacilina 1µg.			X	
Halo de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de vitis vinifera.			X	
Halo de inhibición del extracto etanólico concentrado de la semilla de vitis vinifera y oxacilina 1µg.			X	
Solución salina			X	

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

ANEXO 06

Procedimiento

- a. Identificación de la planta de *Vitis vinifera* en el Herbarium Truxillense Hut de la Universidad Nacional De Trujillo.



- b. Técnica para recolección, conservación de la semilla de *Vitis Vinífera*.
Material Vegetal: La semilla del fruto de *Vitis Vinífera* fueron recolectados al azar del distrito de Cascas, La Libertad.

Para poder generar extracto se usó 5 Kg de uvas y se llevó al laboratorio de microbiología San José de la ciudad de Trujillo, se lavó el fruto con agua clorada, luego se obtuvo la semilla tras la separación del fruto, seguidamente fue colocado en estufa a 40°C para deshidratar por tres días, se pesó la semilla en balanza electrónica. Seguidamente se trituró en un mortero de porcelana y se depositaron en bolsas plásticas oscuras herméticas.



Fruto de *Vitis vinífera*



Semilla de *Vitis vinífera*

c. Procedimiento de obtención del extracto etanólico de la semilla de *Vitis Vinífera*.⁴⁷

El extracto etanólico de la semilla de *Vitis Vinífera* se obtuvo por el método de maceración en etanol de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de la muestra triturada previamente y 200 ml de etanol 96°, se tapó el frasco herméticamente y se envolvió con papel aluminio. Seguidamente se llevó al horno a 40°C por 8 días con agitación de 4 veces diarias. Después, se hizo una doble filtración; primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman N°41. Este filtrado, se evaporó por convección en estufa a 40°C, por 2 días, hasta que quede a una concentración mayor a 100 mg/mL. De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) concentrado, considerando concentración al 100%; que fue guardado en un frasco de vidrio ámbar a 4°C hasta su utilización.



Obtención del extracto etanólico de semillas de *Vitis vinífera*

- d. Técnica de la siembra del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en medio Mueller-Hinton y aplicación de discos embebidos con extracto etanólico de *Vitis vinífera*.⁴⁴

Se usó agar Mueller-Hinton (MHA) como medio de cultivo. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos. Después, se depositó en Placas Petri estériles, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidifique.

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02 y M100.

- Se preparó el inóculo tomando con el asa de siembra previamente esterilizada 5 colonias de un cultivo bacteriano menor de 24 horas y se suspendió en 3 ml de suero salino estéril.
- Inoculó la superficie seca de una placa de MHA rayando con la torunda embebida con inóculo, sobre toda la superficie de agar estéril y aseguró una distribución uniforme.
- Se preparó 10 discos de sensibilidad colocando 10 µL del EE al 100% sobre un disco con oxacilina 1 µg. Asimismo, se preparó otros 10 discos, de papel Whatman N°1 de 6mm de diámetro, con 10 µL del EE al 100%.
- Con una pinza, se colocó un disco con la combinación de EE y oxacilina, un disco con EE y un disco con oxacilina, sobre la superficie de una placa con MHA sembrada, a una distancia mínima unos de otros de 1 cm presionando ligeramente con el fin de asegurar el contacto con el agar. Se repitió en 10 placas.
- Luego se realizó la incubación de las placas en posición invertida a 37°C durante 24 h.
- Se midieron los halos de inhibición (expresado en mm) y se caracterizó la actividad inhibitoria de la bacteria estudiada.



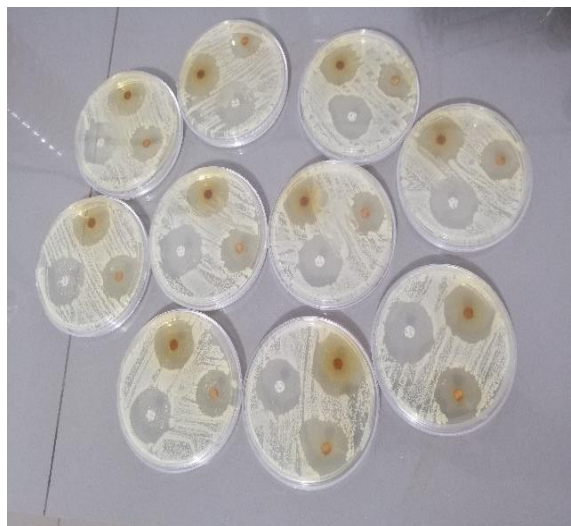
Preparación de los discos de papel filtro con los antibacterianos



Siembra de *S. aureus* en Agar
Müller Hinton



Colocación de los discos con los
antibacterianos



Halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus*

ANEXO 07

Análisis estadístico

Pruebas de normalidad							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Grupos	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Halos	EAVV	0,200	10	0,200*	0,953	10	0,709
	EAVVO XA	0,174	10	0,200*	0,952	10	0,691
	OXA	0,200	10	0,200*	0,953	10	0,709
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.							
a. Corrección de significación de Lilliefors							

Prueba de homogeneidad de varianzas

ANOVA					
Halos					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	511,667	2	255,833	119,7 14	0,000
Dentro de grupos	57,700	27	2,137		
Total	569,367	29			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Halos						
HSD Tukey						
(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
EAVV	EAVVO XA	-8,50000*	0,65376	0,000	-10,1210	-6,8790
	OXA	-9,00000*	0,65376	0,000	-10,6210	-7,3790
EAVVO XA	EAVV	8,50000*	0,65376	0,000	6,8790	10,1210
	OXA	-,50000	0,65376	0,727	-2,1210	1,1210
OXA	EAVV	9,00000*	0,65376	0,000	7,3790	10,6210
	EAVVO XA	,50000	0,65376	0,727	-1,1210	2,1210
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.						

Fuente: Reporte de resultados SPSS Vs 26

Datos Descriptivos de los halos de inhibición producidos por los diferentes
agentes antibacterianos

Halos	EAVV	Media	34,6000	0,49889
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	33,4714
			Límite superior	35,7286
		Media recortada al 5%	34,6111	
		Mediana	35,0000	
		Varianza	2,489	
		Desviación estándar	1,57762	
		Mínimo	32,00	
		Máximo	37,00	
		Rango	5,00	
		Rango intercuartil	3,00	
		Asimetría	-,229	0,687
		Curtosis	-,820	1,334
	EAVVOXA	Media	43,1000	,37859
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	42,2436
			Límite superior	43,9564
		Media recortada al 5%	43,1111	
		Mediana	43,0000	
		Varianza	1,433	

	Desviación estándar		1,19722	
	Mínimo		41,00	
	Máximo		45,00	
	Rango		4,00	
	Rango intercuartil		2,00	
	Asimetría		-,233	0,687
	Curtosis		-,369	1,334
OXA	Media		43,6000	0,49889
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	42,4714	
		Límite superior	44,7286	
	Media recortada al 5%		43,6111	
	Mediana		44,0000	
	Varianza		2,489	
	Desviación estándar		1,57762	
	Mínimo		41,00	
	Máximo		46,00	
	Rango		5,00	
	Rango intercuartil		3,00	
	Asimetría		-,229	0,687
	Curtosis		-,820	1,334

ANEXO 08

Manual de procedimientos de Bioseguridad



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BIOSEGURIDAD EN LABORATORIOS DE ENSAYO, BIOMÉDICOS Y CLÍNICOS



SERIE DE NORMAS TÉCNICAS N° 18

ANEXO 09

Ley N° 26839

Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica

Ley N° 26839

EL PRESIDENTE DE LA REPUBLICA POR CUANTO: El Congreso de la República ha dado la Ley siguiente:

EL CONGRESO DE LA REPUBLICA

Ha dado la Ley siguiente:

LEY SOBRE LA CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO SOSTENIBLE DE LA DIVERSIDAD BIOLOGICA

TITULO I: DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1.- La presente ley norma la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes en concordancia con los artículos 66o. y 68o. de la Constitución Política del Perú.

Los principios y definiciones del Convenio sobre Diversidad Biológica rigen para los efectos de aplicación de la presente ley.

Artículo 2.- Cualquier referencia hecha en la presente Ley a "Convenio" debe entenderse referida al Convenio sobre la Diversidad Biológica, aprobado por Resolución Legislativa No. 26181.

Artículo 3.- En el marco del desarrollo sostenible, la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica implica:

- a) Conservar la diversidad de ecosistemas, especies y genes, así como mantener los procesos ecológicos esenciales de los que dependen la supervivencia de las especies.
- b) Promover la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de la diversidad biológica.
- c) Incentivar la educación, el intercambio de información, el desarrollo de la capacidad de los recursos humanos, la investigación científica y la transferencia tecnológica, referidos a la diversidad biológica y a la utilización sostenible de sus componentes.
- d) Fomentar el desarrollo económico del país en base a la utilización sostenible de los componentes de la diversidad biológica, promoviendo la participación del sector privado para estos fines.

Artículo 4.- El Estado es soberano en la adopción de medidas para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica.

En ejercicio de dicha soberanía el Estado norma y regula el aprovechamiento sostenible de los componentes de la diversidad biológica.

Artículo 5.- En cumplimiento de la obligación contenida en el artículo 68o. de la Constitución Política del Perú, el Estado promueve:

- a) La priorización de acciones de conservación de ecosistemas, especies, y genes, privilegiando aquellos de alto valor ecológico, económico, social y cultural identificados en la Estrategia Nacional sobre Diversidad Biológica a que se refiere el artículo 7o. de la presente ley.
- b) La adopción de un enfoque integrado para el manejo de tierras y agua, utilizando la cuenca hidrográfica como unidad de manejo y planificación ambiental.
- c) La conservación de los ecosistemas naturales así como las tierras de cultivo, promoviendo el uso de técnicas adecuadas de manejo sostenible.

ANEXO 10

Constancia de asesoramiento



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE PROYECTO DE TESIS

El que suscribe, Jaime Abelardo Polo Gamboa docente de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas.

Hace CONSTAR

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis, el(la) estudiante Villanueva Valdez Jhenny Jovana de esta Superior Casa de Estudios, viene trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:

"Sinergia bactericida del extracto etanólico de Vitis vinifera con oxacilina sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923 in vitro"

que será presentado para optar el Título Profesional de Médico Cirujano.

En tal virtud, asumo el asesoramiento del Proyecto mencionado en calidad de ASESOR ESPECIALISTA, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada sólo para fines académicos que estime conveniente.

Dado en la ciudad de Trujillo a los 24 días del mes de Mayo del año 2020.


Jaime A. Polo Gamboa
MICROBIOLOGO
CBP 8251

ANEXO 11

Constancia de ejecución en el laboratorio

**San Jose**
LABORATORIO CLINICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde JHENNY YOVANA VILLANUEVA VALDEZ, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Sinergia bactericida del extracto etanólico de *Vitis vinifera* con oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in vitro", durante los días 22 al 27 de septiembre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 27 días del mes de octubre de 2020.


José Luis Calla Quevedo
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - ☎ 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/